

CFM 03526
10/810, 520 US
CN

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 4月 2日
Date of Application:

出願番号 特願 2003-099463
Application Number:

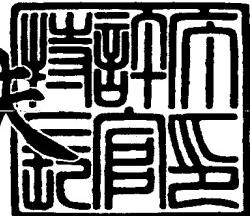
[ST. 10/C] : [JP 2003-099463]

出願人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2004年 4月 19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 251775
【提出日】 平成15年 4月 2日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 1/68
【発明の名称】 感染症起炎菌增幅反応用プライマー及びプライマーセット
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 山本 伸子
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 川口 正浩
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 鈴木 智博
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 吉井 裕人
【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 石井 美絵

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 塚田 譲

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 小倉 真哉

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076428

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康徳

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100112508

【弁理士】

【氏名又は名称】 高柳 司郎

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100115071

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康弘

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100116894

【弁理士】

【氏名又は名称】 木村 秀二

【電話番号】 03-5276-3241

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003458

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102485

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 感染症起炎菌増幅反応用プライマー及びプライマーセット

【特許請求の範囲】

【請求項1】 感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーであって、

以下の(1)～(6)の塩基配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドからなる感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

- (1) 5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
- (2) 5' GCGGCAGGCCTAACACACATGCAAG 3'
- (3) 5' GCGGCAGGCTTAACACACATGCAAG 3'
- (4) 5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'
- (5) 5' ATCCAACCGCAGGTTCCCTAC 3'
- (6) 5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCTAC 3'

【請求項2】 ヒトゲノムDNAの塩基配列と3塩基以上配列の異なることを特徴とする請求項1記載の感染症起炎菌増幅反応用プライマー。

【請求項3】 感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーセットであって、

以下の(1)～(3)の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上と、(4)～(5)の塩基配列のうちの少なくとも一つ以上の複数の塩基配列の各々を有するオリゴヌクレオチドからなる複数のプライマーを含むことを特徴とする感染症起炎菌増幅反応用プライマーセット。

- (1) 5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
- (2) 5' GCGGCAGGCCTAACACACATGCAAG 3'
- (3) 5' GCGGCAGGCTTAACACACATGCAAG 3'
- (4) 5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'
- (5) 5' ATCCAACCGCAGGTTCCCTAC 3'
- (6) 5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCTAC 3'

【請求項4】 ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR反応させることを特徴とする請求項2記載の感染症起炎菌増

幅反応用プライマーセット。

【請求項5】 請求項3に記載の感染症起炎菌增幅反応用プライマーセットを用いてPCR増幅処理を行なってDNAプローブによる感染症起炎菌の検出を行なうことを特徴とする感染症起炎菌検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、感染症疾患の原因菌である感染症起炎菌の検出及び／又は同定に関する。特に、感染症起炎菌の検出及び／又は同定に好適な感染症起炎菌のPCR増幅処理に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析が創薬を初め種々の領域で行なわれている。このような解析では、各種遺伝子セット（プローブ）が配置されたマイクロアレイにそれぞれ異なった検体DNAを反応させ、各検体に存在するそれぞれの遺伝子量を比較して、各ステージで大量に存在する（発現量の高い）遺伝子、或いは逆に不活性化している（発現量の低い）遺伝子を分類し、機能と関連付けて解析するプロセスを経る。

【0003】

上記マイクロアレイとしては、例えば、スタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によるマイクロアレイが知られており、例えば、宝酒造からがん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布したDNAチップ、ヒト由来既知遺伝子約1000種類のcDNA断片をスライドガラスに貼り付けたチップが市販されている。

【0004】

一方、Affymetrixのチップは、上記既知遺伝子cDNAを元にオリゴヌクレオチドプローブセットを設計し、基板上の合成によりプローブを配置したもので、一枚のチップ上に高密度にオリゴプローブが配置され、一度に一万を超える遺伝子の発現レベルを解析できるように設計されている。

【0005】

以上のようなマイクロアレイの用途として、感染症の起炎菌検査が注目されており、感染症起炎菌検査を目的としたプローブセットの提案もいくつかなされている。

【0006】**【発明が解決しようとする課題】**

マイクロアレイを用いた細菌検査における重要なポイントは、感染菌数が少なくて検出できることである。そのために、プライマーを用いたPCR反応等による感染菌のDNAの塩基配列における特定の部位を増幅することが有効である。例えば、16s rRNA遺伝子配列はおよそ1700塩基対の情報中に菌種特有な配列を含み、その配列を利用することによりある程度の分類が可能であると考えられている。したがって、細菌の検出／同定においては、細菌のDNA塩基配列中の16s rRNA部分を用いるのが好ましい。したがって、この16s rRNA部分を増幅することが要望されている。

【0007】

しかしながら、種々の菌の遺伝子配列は部分的には明らかにされていても、16s rRNAの全長が解明されている訳ではなく、PCR増幅反応用のプライマーの設計は容易ではない。

【0008】

本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、感染症起炎菌の検出及び／又は同定を目的に、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反応用プライマーを提供することを目的とする。

【0009】

また、本発明の他の目的は、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16s rRNAを増幅可能なプライマーセットを提供することにある。

【0010】

更に、本発明の他の目的は、複数種類の起炎菌の16s rRNAを同一PCR条件で増幅可能であるようなプライマーセットを提供することにある。

また、ヒト血液検体に対して、該プライマーセットのうちの全てを同時に用いて、PCR反応を行なうことにより、ヒトゲノム由来の遺伝子を増幅することなく、上記菌種のいずれも増幅可能であることを特徴とするプライマーセットを提供する。具体的には、ヒトゲノム遺伝子と3塩基以上異なる配列を持つプライマーセットを提案する。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するための本発明による感染症起炎菌増幅反応用プライマーは、感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーであって、(1) 5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'、(2) 5' GCGGCAGGCC TAACACATGCAAG 3'、(3) 5' GCGGCAGGCTAACACATGCAAG 3'、(4) 5' ATCCAGCC GCACCTTCCGATAC 3'、(5) 5' ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3'、(6) 5' ATCCAGCC GCAGGTTCCCCTAC 3' の塩基配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について説明する。

【0013】

本実施形態では、感染症の起炎菌同定の為に必要な遺伝子増幅の手段に関わるものであって、より具体的には、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター・クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数の16s rRNA遺伝子配列を増幅するプライマーセットを説明する。

【0014】

本実施形態のプライマーセットは、感染症起炎菌同定のために行なわれるPCR反応において良好な増幅結果を与えるように設計されている。ここで「良好な」とは、目的の16s rRNAが十分増幅されていることのみならず、16s rRNA以外の産物が無いことを意味する。

また、ここで「良好な」とは、検体中に含まれる検体由来のヒトゲノム遺伝子

を増幅せずに、感染症起炎菌16s rRNAのみを増幅することを意味する。

【0015】

本実施形態に用いられる検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、喀痰、胃液、膣分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等、細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような環境中の水等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象となり得る。

【0016】

また、本実施形態に用いられるPCR反応とは、抽出した核酸そのものを鋳型として用いたPCR反応、或いは該PCR増幅物を鋳型として、さらに配列番号1-3、或いは配列番号4-6の片側のプライマーを用いた非対称PCR反応、可視化のために標識物を取り込ませるPCR法等いずれの反応をも含む。

【0017】

以下実施例によりさらに詳細に説明する。

【0018】

【実施例】

以下の実施例では、上述した感染症起炎菌の一つであるエンテロバクター・クロアカエ菌（以下、Enterobacter cloacae）の16s rRNA遺伝子の増幅について説明する。

【0019】

〔1. 検体増幅用PCR Primer の準備〕

起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子（標的遺伝子）増幅用PCR Primerとして表1に示す核酸配列を設計した。

【0020】

具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1500塩基長の16s rRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度をできるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように

複数種類のプライマーを設計した。

【0021】

	Primer No.	配列番号	配列
Forward Primer	F-1	1	5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
	F-2	2	5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3'
	F-3	3	5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3'
Reverse Primer	R-1	4	5' ATCCAGCCGCACCTTCGATAAC 3'
	R-2	5	5' ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3'
	R-3	6	5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCCTAC 3'

表中に示したプライマーは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製され、3種のForward Primerと3種のReverse Primerの全てを混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10 pmol/ μ lとなるようにTE緩衝液に溶解した。なお、本実施例では全てのForward PrimerとReverse Primerを用いたが、Forward PrimerとReverse Primerの夫々から1～3種類ずつを用いるようにしてもよい。

【0022】

[2. Enterobacter cloacae Genome DNA（モデル検体）の抽出]

[2-1. 微生物の培養 & Genome DNA 抽出の前処理]

まず、Enterobacter cloacae 標準株を、定法に従って培養した。

【0023】

この微生物培養液を1.5ml容量のマイクロチューブに1.0ml (OD₆₀₀=0.7) 採取し、心分離で菌体を回収した(8500rpm、5min、4°C)。上精を捨てた後、Enzyme Buffer (50mM Tris-HCl : p.H. 8.0、25mM EDTA) 300 μ lを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は、再度、遠心分離で菌体を回収した(8500rpm、5min、4°C)。上精を捨てた後、回収された菌体に、以下の酵素溶液を加え、ミキサーを用いて再懸濁した。

【0024】

Lysozyme 50 μ l (20 mg/ml in Enzyme Buffer)

N-Acetyl muramidase SG 50 μ l (0.2 mg/ml in Enzyme Buffer)。

【0025】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37℃のインキュベーター内で30分間静置し、細胞壁の溶解処理を行った。

【0026】

[2-2. Genome抽出]

以下に示す微生物のGenome DNA抽出は、核酸精製キット (MagExtractor -Genome- : TOYOB0社製) を用いて行った。

【0027】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750 μ lと磁性ビーズ40 μ lを加え、チューブミキサーを用いて、10分間激しく攪拌した（ステップ1）。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ2）。

次に、洗浄液 900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁を行った（ステップ3）。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ4）。

【0028】

ステップ3、4を繰り返して2度目の洗浄（ステップ5）を行った後、70%エタノール 900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁した（ステップ6）。

【0029】

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた（ステップ7）。

【0030】

ステップ6、7を繰り返して70%エタノールによる2度目の洗浄（ステップ8）を行った後、回収された磁性粒子に純水100 μ lを加え、チューブミキサーで10分間攪拌を行った。

【0031】

次に分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を新しいチューブに回収した。

【0032】

[4-3. 回収したGenome DNAの検査]

回収された微生物（Enterobacter cloacae 株）のGenome DNAは、定法に従つて、アガロース電気泳動と260/280nmの吸光度測定を行い、その品質（低分子核酸の混入量、分解の程度）と回収量を検定した。

【0033】

本実施例では、約10 μ gのGenome DNAが回収され、Genome DNAのデグラデーションやrRNAの混入は認められなかった。回収したGenome DNAは、最終濃度50ng/ μ lとなるようにTE緩衝液に溶解し、以下に使用した。

【0034】

上記DNAを用いて以下の反応溶液を調製した。

【0035】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 μ l
Template Genome DNA	2 μ l (100ng)
Forward Primer mix	2 μ l (20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 μ l (20pmol/tube each)
Cy-3 dUTP (1mM)	2 μ l (2nmol/tube)
H ₂ O	17 μ l
Total	50 μ l

【0036】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0037】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	←
65°C	45 sec.	35 Cycles
72°C	45 sec.	↓
72°C	10 min.	

【0038】

反応終了後、精製用カラム（QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit）を用いてPrimerを除去した後、増幅産物をゲル電気泳動により検討した。1500塩基対領域に1バンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物は無かった。

【0039】

なお、上述した他の感染症起炎菌（黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌）についても上記エンテロバクター クロアカエ菌と同様の手順によりPCR増幅を行なったところ、やはり良好な増幅結果を得ることができた。

【0040】

（実施例2） 血液と菌液の混合物からの16sRNA遺伝子の増幅
ヒトの血液 $200\mu l$ （採血EDTA血）に実施例1で培養したEnterobacter_cloacae を103、104、105加え、菌血症モデル系とした。この溶液のそれぞれにN-アセチルムラミダーゼ溶液（0.2 mg/ml in Enzyme Buffer）を加え、37

℃30分加温した後、Qiamp Blood mini Kit（キヤゲン社製）を用いてDNAを抽出し、PCR反応用のテンプレートとした。

これらのDNAに対して実施例1と同様、プライマーセットを用いてPCR反応を行なった。

【0041】

その結果、実施例1と同様、1500塩基対長領域にバンドが検出され、良好にPCR反応が行なわれていることが確認できた。また、副産物はなく、そのバンドから求めたPCR増幅産物の量は、加えた菌量に比例していた。このことは、このプライマーセットを用いた際に、ヒトゲノムのPCR産物はなく、Enterobacter_cloacae の16s RNAのみが増幅されたことを示している。

【0042】

以上説明したように、本実施形態によれば、複数種類の感染症起炎菌の遺伝子中の16s rRNA部分を効率良く、また高い純度で増幅することができる。

【0043】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、感染症起炎菌の検出及び／又は同定を目的とした、検体中の起炎菌の16s rRNAを増幅する為のPCR反応用プライマーが提供される。

また、本発明によれば、複数の菌種に共通に利用可能で、菌種が不明な状態でも効果的に起炎菌の16s rRNAを増幅可能なプライマーセットが提供される。

更に、本発明によれば、複数種類の起炎菌の16s rRNAを同一PCR条件で増幅可能であるようなプライマーセットが提供される。

【配列表】

〈110〉キヤノン株式会社 CANON, INC.

〈120〉感染症起炎菌増幅反応用プライマー及びプライマーセット

〈160〉6

〈210〉1

〈211〉23

〈212〉DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 1

gcggcgtgcc taatacatgc aag

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 23

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 2

gcggcaggcc taacacatgc aag

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 23

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 3

gcggcaggct taacacatgc aag

⟨210⟩ 4

⟨211⟩ 22

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 4

atccagccgc accttccgat ac

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 22

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨400⟩ 5

atccaaccgc aggttcccct ac

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 22

＜212＞ DNA

＜213＞ Artificial Sequence

＜400＞ 6

atccagccgc aggttccccct ac

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 感染症起炎菌の検出及び／又は同定を目的とした、検体中の起炎菌の16s rRNAを增幅する為のPCR反応用プライマーを提供することを目的とする。

【解決手段】 感染症起炎菌増幅反応用プライマーは、感染症起炎菌の16s rRNA遺伝子配列をPCR増幅させるのに用いられるプライマーであって、（1）5' GCG GCGTGCCTAATACATGCAAG 3'、（2）5' GCGGCAGGCCAACACATGCAAG 3'、（3）5' G CGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3'、（4）5' ATCCAGCCGCACCTCCGATAC 3'、（5）5' ATCCAACCGCAGGTTCCCTAC 3'、（6）5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCTAC 3'の塩基配列のいずれかを有するオリゴヌクレオチドからなる。

特願 2003-099463

出願人履歴情報

識別番号 [000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号
氏 名 キヤノン株式会社